

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

G01N 33/53

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99114416.3

[43]公开日 2000年3月29日

[11]公开号 CN 1248702A

[22]申请日 1999.9.3 [21]申请号 99114416.3

[71]申请人 何农跃

地址 210096 江苏省南京市四牌楼2号

共同申请人 陆祖宏 朱纪军 刘全俊 陈亚利

[72]发明人 何农跃 陆祖宏 朱纪军

刘全俊 陈亚利

[74]专利代理机构 江苏省专利事务所

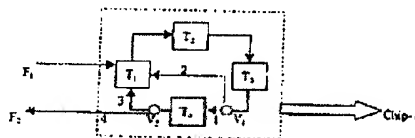
代理人 吴胜元

权利要求书1页 说明书8页 附图页数2页

[54]发明名称 PCR微阵列探针循环检测型生物芯片

[57]摘要

本发明PCR微阵列探针循环检测型生物芯片涉及的是一种PCR微阵列探针杂交检测型生物芯片的新方案,尤其是采用气体或液体往复式流动方式多温度区域聚合酶链反应基因选择性扩增,结合固相微探针阵列技术进行基因诊断的新型生物芯片。其特征在于将PCR循环过程与探针杂交检测设计在一个PCR微阵列探针芯片内,PCR的变性、退火、延伸与微阵列探针杂交的四个微反应器构成一个往复式或环绕式循环系统,循环体系中变性、退火、延伸、杂交各自的温度是独立恒温控制的。在同一芯片上集成多个PCR微阵列探针型芯片系统。



ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种 PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片, 其特征在于 1) 将 PCR 循环过程与探针杂交检测设计在一个 PCR 微阵列探针芯片内, 2) PCR 的变性、退火、延伸与微阵列探针杂交反应的四个微反应器构成一个往复式或环绕式循环系统, 从而十分方便地跟踪 PCR 各次循环的效率, 3) 上述的 PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片循环体系中变性、退火、延伸、杂交各自的温度是独立恒温控制的, 4) 在同一芯片上集成多个可用于测量不同样品的 PCR 微阵列探针型芯片系统。

2. 按照权利要求 1 的 PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片, 其特征在于变性、退火、延伸各微反应器可以是微沟槽、微管、微池形式之一。

3. 按照权利要求 1 的 PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片, 其特征在于所用微阵列探针可以是原位合成或通过点样方法制备、低密度或高密度、单功能或多功能的阵列式探针。

4. 按照权利要求 1 的 PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片, 其特征在于退火、延伸二个微反应器可以合并成一个。

PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片

本发明 PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片涉及的是一种 PCR 与探针相结合的检测型生物芯片的新方案,尤其是采用液体环绕式或往复式流动方式多温度区域聚合酶链反应基因选择性扩增,结合固相微探针阵列技术进行基因诊断的新型生物芯片。

生物芯片主要是指通过平面微细加工技术及超分子自组装技术,在固体芯片表面构建的微分析单元和系统。生物芯片可把许多不同功能器件集成在一起,例如,生物样品的预处理,遗传物质的提取,特定基因片段的扩增,生物探针阵列以及毛细管电泳形成整体的微流体系统,以实现了对化合物、蛋白质、核酸、细胞以及其它生物组分的准确、快速、大信息量的筛选或检测。基因芯片是最重要的一类生物芯片,它集成了大量的密集排列的基因探针,能够在短时间内分析大量的基因,使人们可迅速地读取和分析生命的程序。

生物芯片在生物检测、医学检验、药物筛选和基因序列分析上有着极其重要的意义。例如在生物学中,随着分子生物学的不断发展,特别是举世瞩目的人类基因组计划实施以来,有关核酸、蛋白质序列和结构的数据呈指数增长。而下世纪最富挑战性的工作就是人类基因组计划完成后,即在后基因时代,我们如何运用大量的生物分子信息服务于人类社会,并使医学、治疗产生根本革命。在医学中,“系统、器官、组织、细胞层次上的第二阶段医学”正在向“基因水平上的, DNA→RNA→蛋白质→蛋白质与核酸相互作用,以及它们与环境相互作用水平上的第三阶段医学”转化。这种在分子层次上进行的基因诊断与基因治疗,将根本地认识疾病产生的根源,并将有希望根本认识和治疗包括癌症在内的重大疾病。这些生物学、医学的根本变革,一个根本的前提是基因序列的测定和分析。能否有

效快速地进行基因测序与分析，将影响到人类基因组计划的实施，从而影响生物学、医学的进一步发展。传统基因测序所采用的方法包括化学反应、凝胶电泳法等一系列繁杂的步骤，这些方法花费时间较长，且操作繁复，尤其在大规模测序方面费时、并且不适宜便携化快速测序。在对传统基因测序方法进行改进的过程中，以基因芯片为代表的生物芯片技术应运而生。生物芯片技术是将生命科学研究中所涉及的许多不连续的分析过程，如样品制备，化学反应和分析检测等通过采用微电子，微机械等工艺集成到芯片中，使之连续化，集成化，微型化和自动化。这一技术的成熟和应用将在下世纪的疾病诊断和治疗、新药开发、司法鉴定、食品和环境等生命科学相关领域带来一场革命，为生物信息的获取及分析提供强有力的手段。

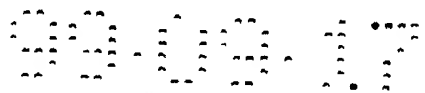
PCR (polymerase chain reaction, 聚合酶链反应) 作为一种选择性体外基因扩增的方法，由于在经 25~35 轮循环后就可使 DNA 扩增 10^6 倍，多年来在科研和医学检验中得到广泛应用。但由于 PCR 存在假阳性等缺陷，自 98 年 6 月起已被国家卫生部禁止用于临床诊断。究其原因，其一是 PCR 过程中诸多实验条件（引物的设计与选择、材料配比、反应时间、温度、循环周期等）造成的不稳定因素导致产生 PCR 的错误扩增。其二是，PCR 过程的后续电泳检测方法仅可判断是不是得到特定长度的片段，而无法确定其具体序列。其三，PCR 反应与检测是两个分立的过程，操作繁琐且增加了污染的机会。因此，对于检测条件和设备有限的中、小医院，PCR 的检测的准确性受到了很大的影响。此外，当前的 PCR 扩增过程对于操作人员的技术水平和素质有很高的要求。

生物（基因）芯片近年来一直是国际上的一个研究热点，并正以惊人的速度向前发展。美国等国际已有许多家公司进入生物芯片领域，研究出把 PCR 与 DNA

阵列相集成的生物芯片。这些系统通常在芯片上制备一个 PCR 微反应池，通过控制微反应的温度循环，进行基因的扩增。接着将扩增后的基因引入杂交池中，与固相微阵列探针杂交，进行检测。Affymetrix 公司则把 PCR 微反应池进一步制备成微流体管道。但目前用于科学研究和医学检验的芯片大多是一个或若干个独立器件。尽管已有将 PCR 技术与芯片检测合为一体的报导，但其特点是整个 PCR 过程在一个微反应池中进行，因而，需要对器件的同一部位反复地升温降温，这将无法对 PCR 结果进行动态跟踪和实时定量分析。而且由于升温降温需要一定的时间，延长了工作时间。

本发明的目的是针对目前 PCR 技术与芯片检测存在不足之处提供一种 PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片，这是一种控制 PCR 反应溶液在不同温度区域进行环绕式或往复式流动扩增的新方案，并将 PCR 技术与基因微阵列探针技术合为一体，构成一个集成型生物芯片，既可简化操作步骤，缩短 PCR 时间，提高效率，又可将反应体系与外界进行严密有效隔离，并使 PCR 扩增—探针杂交检测过程一体化，将 PCR 循环中的变性、退火、延伸过程与微阵列探针芯片构成一个整体，可以将变性、退火、延伸和杂交四个步骤的温度分别控制在恒定温度，从而可避免反复的升温降温过程及由于温控的误差带来的影响。

PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片是采取以下方案实现的：PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片是将 PCR 循环过程与探针杂交检测设计在一个 PCR 微阵列探针芯片内，PCR 的变性退火、延伸与微阵列探针杂交反应的四个微反应器，构成一个往复式或环绕式循环系统，从而十分方便地跟踪 PCR 各次循环的效率，上述 PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片循环体系中变性、退火、延伸、杂交各自的温度是独立恒温控制的，在同一芯片上集成多个可用于测量不同样的 PCR



微阵列探针型芯片系统。变性、退火、延伸各微反应器可以是各种形式，如微沟槽、微管、微池等。微阵列探针可以是原位合成或通过点样方法制备的低密度或高密度、单功能或多功能阵列式探针。退火、延伸各个微反应器可以合并成一个。PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片的反应完成后，检测杂交信号并给出检测结果。

本发明提出了一种控制 PCR 反应溶液在不同温度区域进行环绕或往复式流动扩增的新方案，并将 PCR 技术与基因微阵列探针技术合为一体，构成一个集成型生物芯片，其中微阵列可以是高密度或低密度的、点样制备或原位合成的、单功能或多功能的。既可简化操作步骤，缩短 PCR 时间，提高效率，又可将反应体系与外界进行严密有效的隔离，并使 PCR 扩增-探针杂交检测过程芯片一体化，不需进行电泳分析，而是直接检测杂交信号并给出检测结果。由于探针杂交具有特异性，因而可以排除电泳法无法排除假阳性的缺陷。更重要的是，将 PCR 循环中的变性、退火、延伸过程与微阵列探针芯片构成一个整体，可以将变性、退火、延伸和杂交四个步骤的温度分别控制在恒定温度，从而可避免反复的升温降温过程及由于温控的误差带来的影响。由于采用了环绕式或往复式流动 PCR 扩增技术与杂交检测一体化技术，每一组芯片单元的尺寸大大减小，从而可把几十组或上百组芯片单元集成在一个芯片板上，可同时进行多种生物样品的检测。由于本发明将 PCR 过程与微阵列探针芯片构成一个往复式循环体系，不仅可在多次 PCR 循环后检测结果，更可十分方便地跟踪检测 PCR 每一个循环的效率，从而获得线性的 PCR 结果，并进行动态定量分析，真正可达到快速、准确、自动化、无污染。

本发明提出的 PCR 微阵列探针循环检测型芯片可有多种设计方案，以下将结合附图对本发明作进一步的说明。

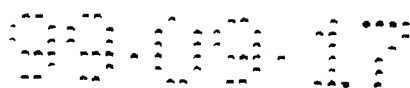


图 1 是本发明循环式 PCR 微阵列探针循环检测型芯片示意图。

图 2 是本发明往复式流动 PCR 微阵列探针循环检测型芯片之一主视图。

图 3 是本发明往复式流动 PCR 微阵列探针循环检测型芯片之一左视图。

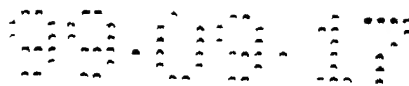
图 4 是本发明往复式流动 PCR 微阵列探针循环检测型芯片之二示意图。

图 5 是本发明往复式流动 PCR 微阵列探针循环检测型芯片之三示意图。

下面举例说明。

参照附图，PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片是将 PCR 循环过程与探针杂交检测设计在一个 PCR 微阵列探针芯片内，PCR 的变性退火、延伸与微阵列探针杂交反应的四个微反应器，构成一个往复式或环绕式循环系统，从而十分方便地跟踪 PCR 各次循环的效率，上述 PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片循环体系中变性、退火、延伸、杂交各自的温度是独立恒温控制的，在同一芯片上集成多个可用于测量不同样的 PCR 微阵列探针型芯片系统。变性、退火、延伸各微反应器可以是各种形式，如微沟槽、微管、微池等。微阵列探针可以是原位合成或通过点样方法制备的低密度或高密度、单功能或多功能阵列式探针。退火、延伸各个微反应器可以合并成一个。PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片的反应完成后，检测杂交信号并给出检测结果。

参照附图 1，本发明提出的环绕式 PCR 微阵列探针循环检测型芯片，PCR 过程的变性在 T1 微流体反应器中进行，退火与延伸在微反应器 T2 和 T3 中进行，T4 为微阵列探针。微阵列探针可以是原位合成或通过点样法制备的低密度或高密度、单功能或多功能的阵列式探针。V1 和 V2 为三通阀。上述各元件（T1、T2、T3、T4、V1、V2）构成一个 PCR-微阵列探针循环检测型芯片 chip-1，由多个 chip-1 可组成一个多 chip 芯片板。成为在同一芯片上集成多个可用于测量不同样品 PCR 微阵



列探针型芯片系统。

参照附图 2、3，本发明提出的往复式流动 PCR 微阵列探针检测型芯片之一。

图 2 为主视图，图 3 为左视图，在基片 A 上开有微沟槽 1, 2, 3, 4……n，这些微沟槽两端分别以微孔与相邻微沟槽相通，基片 A 分为 4 个温度区 T1、T2、T3、T4。分别对应于 PCR 过程的变性、退火、延伸及杂交反应的温度。每个微沟槽在 T4 区内都有微阵列探针，在基片 A 的反面开有与上述微沟槽垂直的四个沟槽。变性、退火、延伸、各微反应器可以是各种型式，如微沟槽、微管、微池等其中之一。1, 2, 3, 4……n 中都布有两小块与相应沟槽吻合又能在其中自由滑动的小铁块。这两小铁块表面覆有一疏水有机聚合物薄膜。PCR 反应溶液事先注入微沟槽中的两小铁块之间，然后以一透明薄膜覆盖密封，有微沟槽的基片 A 及基片 A 上覆盖的透明材料构成芯片。使用时，试样 a、b、c、d……n 由注射器或其它进样器穿透薄膜注入 PCR 反应溶液中，然后以玻片压紧固定。轻摇混匀后，即可开始 PCR 反应，首先在 T1 区进行变性，然后由磁铁 N 带动微沟槽中的小铁块连同反应体系溶液迅速移到 T2 区进行退火，再移到 T3 区进行延伸；延伸后迅速移到 T1 区开始第二个循环，或先移到 T4 区进行杂交反应后再移到 T1 开始第二个循环。如此继续循环过程，直到获得所有结果。

参照附图 4，本发明提出的往复式流动 PCR 微阵列探针检测型芯片之二。与附图 2、3 设计不同之处在于不是靠磁铁带动微沟槽内小铁块进而驱动 PCR 反应液体进行 PCR 循环，而是由通过控制气体 F1、F2 的压力差驱动 PCR 溶液 1, 2……n 在微沟槽内往复运动，因此不需磁铁。其余结构的原理同附图 2、3。

参照附图 5，本发明提出的往复式流动 PCR-微阵列探针检测型芯片之三，与附图 2、3 不同之处在于芯片上的微沟槽 1, 2……n 两端不再分别与沟槽相通，而

是另以微沟槽将上述 1, 2……n 每个沟槽两端独立联接起来。这样既保持 PCR 体系始终处于一个压力平衡状态, 便于磁铁 N 带动小铁块并驱动 PCR 反应液体, 又彼此完全隔离, 互不污染。其余设计同附图 2、3。

实施实例 1 (线性定量分析): 参照附图 1, 乙型肝炎病毒的 PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片的使用。将由简单步骤预处理所得 DNA 模板与 PCR 反应液由 F1 导入 T1 中, 在 94℃变性 45 秒, 然后迅速流入 T2 中于 45℃退火 60 秒, 然后在 T3 于 72℃延伸 2 分钟, 再经 V1 沿路径 1 进入 T4 与微阵列探针杂交, 检测该 PCR 循环效率。然后经 V2 由路径 3 入 T1 开始第二个 PCR 循环。如此, 可得到每一个 PCR 循环的效率, 并进行定量分析监控。30 次循环后液体经 V2 由导出口 F2 导出。检测杂交信号并给出结果。

实施实例 2 (不作线性定量分析): 参见附图 1, 乙型肝炎病毒的 PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片的使用。取病人血样 (经预处理后与 PCR 反应液混和, 由 F1 导入 T1 中, 经下述流程 T1 (94℃, 45 秒) → T2 (45℃, 60 秒) → T3 (72℃, 2 分钟) → V1 → 通道 2 → T1, 进行 30 次循环后, 将反应液体经 V1、通道 1 导入 T4 中与微阵列探针杂交, 杂交后由导出口 F2 导出液体, 检测杂交信号并给出结果。

实施实例 3 (线性定量分析): 参见附图 2、3, 多功能的多种肝炎病毒的 PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片的使用。将一组预处理所得病人血清透过密封膜分别注入附图 2、3 中 PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片中的微沟槽 1, 2, 3, …… n 中的两小铁块之间的 PCR 溶液中, 然后用玻璃板压紧, 并用夹子将玻璃板与整个芯片固定在一起, 轻摇混匀。通过控制器 C5 用磁铁 N 把样品移到 T1 区 (94℃) 变性 45 秒, 然后迅速移到 T2 (45℃) 区退火 60 秒, 然后移到 T3 区 (72℃) 延

伸 2 分钟，再移到 T4 区与微阵列探针杂交。检测 PCR 循环效率。随后移到 T1 区开始第二个 PCR 循环，如此进行循环 30 次。可得到每一个 PCR 循环的效率，并进行定量分析监控。检测杂交信号并给出结果。

实施实例 4（不作线性定量分析）。参见附图 4，高密度的乙型肝炎病毒的 PCR 微阵列探针循环检测型生物芯片检测单点突变。取病人血样（经预处理后），1，2，……n 透过薄膜注入图 2 中微沟槽 1，2……n 中的两个小铁块之间的 PCR 溶液中，用玻璃板压紧，并用夹子将玻璃板与整个芯片固定在一起，再将芯片嵌入到自行设计的 PCR 仪中的 4 个加热元件上。然后通过控制器以磁铁 N 将样品移到 T1 区（94℃）变性 45 秒，再移到 T2 区（45℃）退火 60 秒，再移到 T3 区（72℃）延伸 2 分钟，然后迅速移到 T1 区，开始第二个 PCR 循环，30 次 PCR 循环后，移到 T4 区与微阵列探针杂交。检测杂交信号并给出结果。

实施实例 5、6，分别类似于实施实例 3、4，但反应液体的移动通过调控微沟槽 1，2……n 两端的压力差来控制（参见附图 4）。

实施实例 7、8。操作步骤同实施实例 3、4，但改用图 5 所示结构的芯片。

附图中小黑块 ■■■ 为微铁块，阴影 ▨ 为探针所在区域。

说明书附图

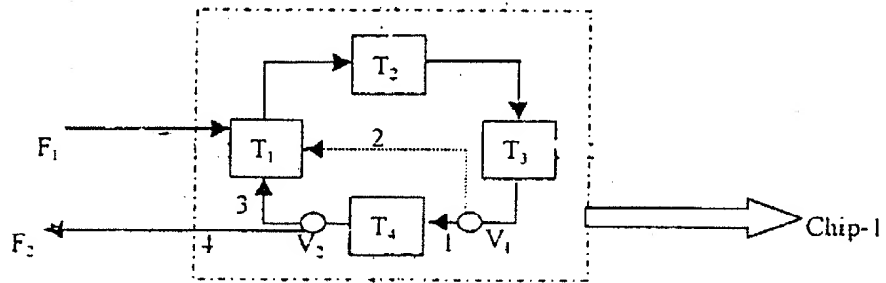


图 1

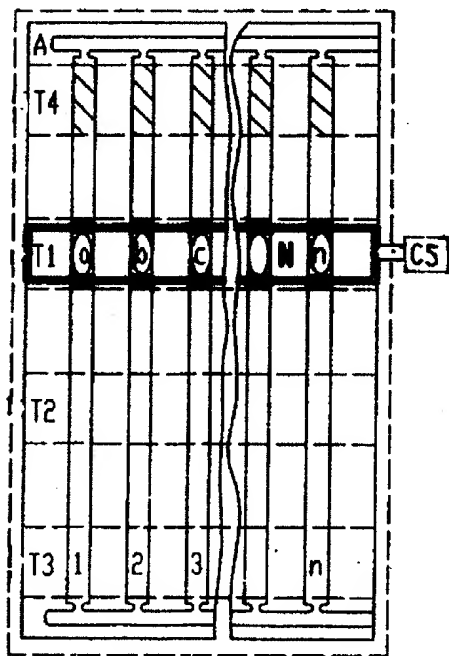


图 2

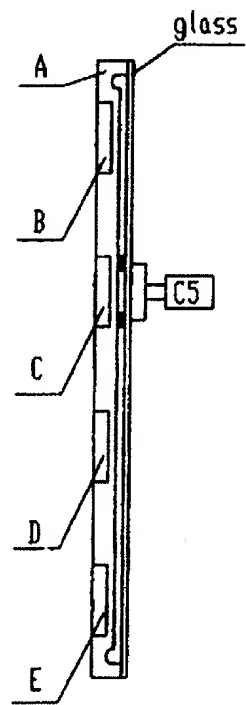


图 3

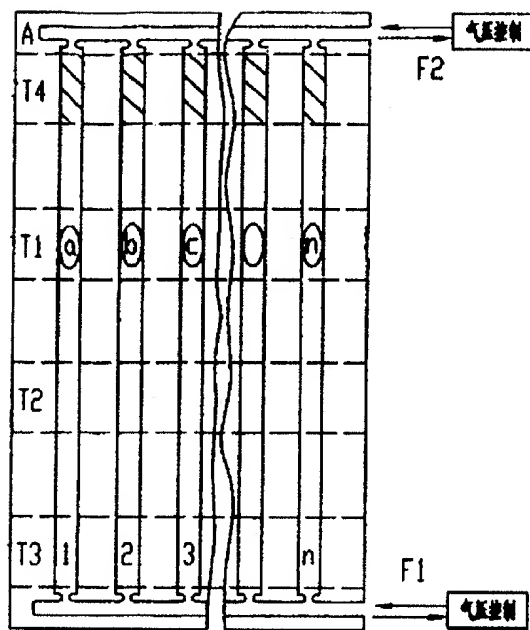


图4

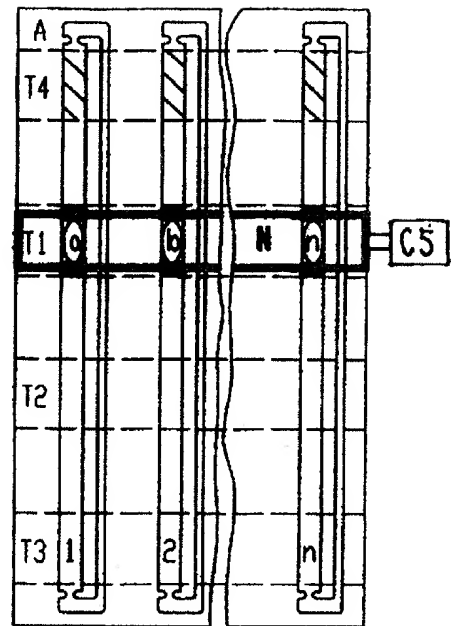


图5